Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. N. Henning

Untersuchungen über die Trypsin-Inhibitor-Kapazität des menschlichen Serums

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Jörg Alter
aus Nürnberg

1963 № 2

Referent: Professor Dr. N. Henning

Dekan: Professor Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 3. 1963

Reprinted from
Clinica Chimica Acta
Elsevier Publishing Company,
Amsterdam
Printed in The Netherlands

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TRYPSIN-INHIBITOR-KAPAZITÄT DES MENSCHLICHEN SERUMS

H. SCHÖN, B. RÄSSLER UND J. ALTER*
*Medizinische Klinik der Universität Erlangen***, *Nürnberg (Deutschland)*

(Eingegangen den 17. Januar, 1962)

EINLEITUNG

1897 stellten CAMUS UND GLEY[1] mittels der Beeinflussung der Milchgerinnung durch Pankreassaft und Blutserum fest, dass im Serum Substanzen enthalten sind, welche die proteolytische Aktivität des Pankreassaftes hemmen.

DELEZENNE UND POZERSKI[2] sowie CHRISTENSEN[3] fanden, dass die antitryptische Eigenschaft des Serums beim Schütteln mit Chloroform um 90% schwindet.

LANDSTEINER[4] schrieb diese Hemmwirkung vorerst noch dem Serumalbumin zu[5].

SHULMAN[1] wies durch Differential-Titrationen nach, dass im Serum des Menschen zwei Inhibitoren vorhanden sind, von denen der eine ausschliesslich Trypsin, der andere dagegen Trypsin und Plasmin hemmt.

JACOBSSON[1] bestätigte das Vorhandensein von zwei Inhibitoren. Er konnte beide auf elektrophoretischem Wege trennen und fand, dass ein Inhibitor mit den α_1-Globulinen, der andere mit den α_2-Globulinen wandert.

NORTHROP UND HUSSEY[8] beschrieben, dass Trypsin mit dem Trypsininhibitor des Blutplasmas eine reversibele, stöchiometrische Verbindung eingeht[9].

SHULMAN[10] dagegen fand, dass die Verbindung von Trypsin und Serum-Trypsininhibitor stöchiometrisch und nicht reversibel ist.

MCCANN UND LASKOWSKI[11] fanden, dass nur dann eine stöchiometrische und irreversibele Verbindung eingegangen wird, wenn als Lösungsmittel für alle Reagentien physiologische Kochsalzlösung benutzt wird.

Die quantitative Erfassung des Trypsininhibitors im biologischen Material erfolgte bisher stets nach dem Ausmass der Aktivitätshemmung einer unter Standardbedingungen mit und ohne Hemmstoff angesetzten Trypsinlösung. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich daher nur durch die Art der Aktivitätsmessung. Die Vielzahl der verwendeten Methoden lässt sich entsprechend dem eingesetzten Substrat in zwei Gruppen einteilen: (1) Methoden mit natürlichen Substraten, (2) Methoden mit synthetischen Substraten.

(1) Zu den Verfahren, die mittels eines natürlichen Substrates die proteolytische Aktivität bei einem definierten pH bestimmen, gehören die Casein-Methode von KUNITZ[12-23] und die Hämoglobin-Methode von ANSON[7, 24, 25]. Die Aktivitätsmessung erfolgt in beiden Fällen durch Bestimmung der pro Zeiteinheit entstandenen niedermolekularen Eiweissbruchstücke (UV-Absorption, Kolorimetrie) oder nephelome-

* D29.
** Director: Professor Dr. N. HENNING.

trische Bestimmung des verbliebenen Casein. Im Hinblick auf die von SCHÖN UND RÄSSLER "wiederentdeckte" Ca^{2+}-Aktivierung ist bemerkenswert, dass alle angeführten Autoren mit Phosphatpuffer gearbeitet haben.

Beim Formol-Titrations-Verfahren, von WILLSTÄTTER UND WALDSCHMIDT-LEITZ[12, 26, 27], wird als Substrat Gelatine verwendet. Die Messung der Fermentaktivität erfolgt durch Bestimmung der pH-Änderung, die durch die niedermolekularen Bruchstücke im Verdauungsgemisch hervorgerufen wird. Bei der Fibrin-Methode von ASTRUP UND MÜLLERTZ[28] und von ASTRUP UND STERNDORFF[29] wird die proteolytische Aktivität durch die Grösse der auf einer genormten Fibrinplatte durch eine Fermentlösung entstandenen Verdauungsflecken ermittelt. Ein moderneres Verfahren stellt die Markierung der Substrate mit ^{131}J dar[30–32]. Dabei wird durch die Radioaktivität der Filtrate die Konzentration der Spaltstücke und damit der Fermentaktivität bestimmt.

(2) Methoden, die synthetische Substrate verwenden: BERGMANN und seine Schule[33, 34] entwickelten eine Reihe von niedermolekularen, spezifischen Trypsin-Substraten: Benzoyl-, Tosyl-, Hippuryl-*l*-argininamid oder die entsprechenden Lysin-Verbindungen[35]. NARDI[36] und NARDI UND LEES[37] verwenden N-α-Benzoyl-*l*-argininamid-HCl als spezifisches Substrat; das bei der Spaltung frei werdende Ammoniak wird nach CONWAY[38] bestimmt.

BROWN[39] benutzt α-Benzoyl-*l*-arginin-äthylester[40] und bestimmt die Menge des nicht umgesetzten Substrates als Hydroxamsäure durch Kolorimetrie des Fe^{3+}-Komplexes.

RONWIN[41] bestimmt das Ausmass der Hydrolyse mit Hilfe der UV-Adsorption eines zwischen Cu^{2+} und Tosylarginin gebildeten Komplexes.

RIEDEL UND WÜNSCH[47] führten N-Benzoyl-*d*, *l*-arginin-β-naphthylamid-HCl als spezifisches Trypsinsubstrat ein, wobei sie sich des von SELIGMAN[42–46] eingeführten kolorimetrischen Prinzips bedienten. Dieses Substrat wurde von SCHÖN UND RÄSSLER[48, 49] zur Trypsinaktivitätsbestimmung im Darmsaft benutzt.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, für die Bestimmung des Trypsin-Inhibitors im Serum eine moderne Methodik zu erarbeiten, um die klinische Kontrolle der Veränderungen des Inhibitorgehaltes im Blut bei den verschiedenen Erkrankungen zu ermöglichen.

MATERIAL

Reagentien

1. Trypsin-Lösung 100 μg/ml (krist. Trypsin, Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim). *a.* 10 mg Trypsin, 10 ml 0.25 *M* $CaCl_2$-Lösung und 1 ml *N* HCl ad 100 ml mit physiologischer Kochsalzlösung. *b.* 10 mg Trypsin ad 100 ml mit physiologischer Kochsalzlösung. *c.* 10 mg Trypsin und 10 ml 0.25 *M* $CaCl_2$-Lösung ad 100 ml mit physiologischer Kochsalzlösung.

2. Ca–Tris-Puffer pH 7.8. 34.2 ml 0.1 *N* HCl. 25.0 ml einer 0.2 *M* Trishydroxymethylaminomethan-Lösung. 10.0 ml einer 0.25 *M* $CaCl_2$-Lösung werden ad 100 ml mit *aqua bidest.* aufgefüllt.

3. N-Benzoyl-*d*, *l*-arginin-β-naphthylamid-HCl-Lösung (im folgenden nur noch als Substrat bezeichnet). 250 mg Substrat werden auf 50 ml mit Methanol aufgefüllt. Die Lösung enthält 5 mg Substrat pro ml.

4. Perchlorsäure *p.a.*: 25%.

5. Natriumnitrit-Lösung *p.a.*: 0.2%.

6. Ammoniumsulfamat-Lösung *p.a.*: 0.5%.

7. Naphthyläthylendiamin-Lösung *p.a.*, 50 mg Naphthyläthylendiamin-di-HCl werden in 100 ml Methanol gelöst.

8. β-Naphthylamin-Lösung, 20 mg Naphthylamin in 10 ml Methanol gelöst und mit *aqua bidest.* ad 100 ml aufgefüllt.

9. Methanol–Wasser, 10 ml Methanol werden ad 100 ml mit *aqua bidest.* aufgefüllt.

10. Sojabohnen Inhibitor: Sojabohnen-Inhibitor, fünfmal umkristallisiert, Mann Research Lab., New York. Lösung: 50 μg/ml.

11. Trasylol: Firma Bayer, Leverkusen. 1 ml = 1000 KI-Einheiten. Trasylol-Verdünnung 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung.

METHODIK

I. Farbreaktion nach Bratton-Marshall[50]

Zu 1 ml klaren Filtrates des Inkubationsgemisches wird 1 ml $NaNO_2$-Lösung zur Diazotierung zugegeben, und der Ansatz 10 Min bei 37° im Wasserbad inkubiert. Unter Schütteln wird 1 ml Ammoniumsulfamat-Lösung hinzugefügt und erneut bei 37° im Wasserbad 2 Min erwärmt. Diese Zeit genügt für die Beseitigung des überschüssigen $NaNO_2$. Anschliessend werden 2 ml Naphthyläthylendiamin-Lösung hinzugefügt. Der Ansatz wird nun mit einem Stopfen verschlossen, gut durchgeschüttelt und 30 Min bei 37° im Wasserbad unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Beendigung der Kupplungsreaktion und Abkühlen auf Zimmertemperatur (unter Lichtabschluss!) wird die Extinktion der entstandenen blauen Farbe im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 578 mμ, 1-cm Schicht gegen den Leerwert abgelesen.

II. Naphthylamin-Eichkurve

Zur Kontrolle der von uns gewählten methodischen Bedingungen wurde zunächst eine Eichkurve für β-Naphthylamin auf der Grundlage der modifizierten BRATTON-MARSHALL-Reaktion[48, 49] aufgestellt:

Ausführung: 10 ml β-Naphthylamin-Lösung (200 μg/ml) werden mit *aqua bidest.* ad 100 ml aufgefüllt. 0.1–0.5 ml dieser Lösung (20 μg/ml) und 0.1 ml $HClO_4$ pro Ansatz werden mit Methanol–Wasser (10%) auf 1 ml aufgefüllt und die BRATTON-MARSHALL-Reaktion (s.d.) ausgeführt (Fig. 1).

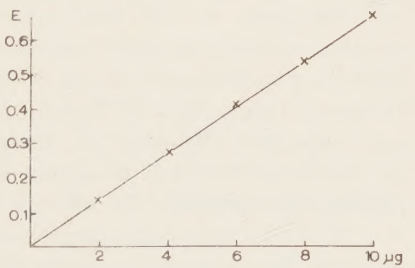

Fig. 1. Naphthylamin-Eichkurve. Abszisse: μg Naphthylamin pro Ansatz. Ordinate: Extinktionswerte (1-cm Schicht, Filter 578 mμ). Die Kurve zeigt das Ergebnis der Diazotierung von 2–10 μg β-Naphthylamin mit 1 ml $NaNO_2$ (0.2%) und der Kupplung mit 2 ml Naphthyläthylendiamin (0.5 mg/ml). Die Extinktionswerte werden im Filter-Photometer bei einer Schichtdicke von 1 cm und bei 578 mμ gegen den Reagentienleerwert abgelesen.

III. Trypsin-Eichkurve

Ausführung: 0.1–0.7 ml frisch bereitete Trypsin-Lösung (100 μg/ml) werden mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) wird 30 Min unter Lichtausschluss im Wasserbad bei 37° inkubiert. Anschliessend wird mit je 1 ml $HClO_4$ (25%) die Reaktion abgestoppt, filtriert und mit je 1 ml klaren Filtrates die angegebene Farbreaktion durchgeführt. Ein Reagentienleerwert ohne Trypsin wurde ebenso behandelt. Die Extinktionsmessung erfolgte gegen diesen Leerwert wie oben angegeben (Fig. 2).

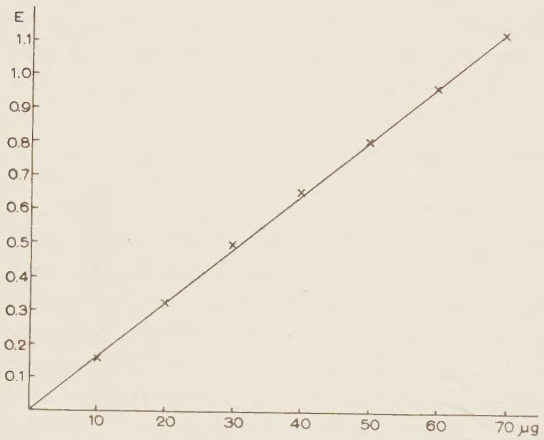

Fig. 2. Trypsin-Eichkurve. Abszisse: μg Trypsin pro Ansatz. Ordinate: Extinktionswerte (1-cm Schicht, Filter 578 mμ) 10–70 μg Trypsin, Ca–Tris-Puffer und 0.5 ml Substrat (5 mg/ml) werden 30 Min bei 37° inkubiert. Das freigesetzte β-Naphthylamin wird mit der BRATTON-MARSHALL-Reaktion bestimmt. Messung der Extinktionen gegen den Leerwert im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 1-cm Schicht und 578 mμ.

IV. Eiweissadsorption

Die für Darmsaft verwendete direkte Kupplung des aus dem Substrat (N-Benzoyl-*d*, *l*-arginin-β-naphthylamid-HCl) freigesetzten β-Naphthylamins mit tetrazotiertem Di-*o*-anisidin (Echtblausalz B)[47–49] wird durch einen höheren Eiweissgehalt in der Probe empfindlich gestört. Diese Störung ist auf Adsorption des β-Naphthylamins an das Eiweiss zurückzuführen. Es war deshalb notwendig, die Beeinflussung der BRATTON-MARSHALL-Reaktion durch Serumeiweiss zu überprüfen.

Ausführung: Steigende Mengen (0.2–1.0 ml) unverdünnten Mischserums wurden in der Reihe A mit Ca–Tris-Puffer auf 3.5 ml, in der Reihe B auf 2.5 ml aufgefüllt, dann zur Reihe A 1 ml Naphthylamin-Lösung (20 μg/ml), zur Reihe B 2 ml Naphthylamin-Lösung 20 μg/ml) gegeben. Anschliessend wurde zu jedem Ansatz beider Reihen 0.5 ml Methanol–Wasser (10%) und 1 ml $HClO_4$ (25%) hinzugefügt. Nach dem Filtrieren wurde mit 1 ml klaren Filtrates je Ansatz die oben angegebene Farbreaktion ausgeführt. Messung der Extinktionen wie oben beschrieben. Als Bezugswert (= 100%) diente die ohne Serumzusatz erhaltene Extinktion von 20 μg und 40 μg Naphthylamin/Ansatz.

Bei 0.2 ml unverdünntem Serum (14 mg Eiweiss) beträgt die Wiederauffindung 96%. Da bei späteren Versuchen das Serum 1 : 25 verdünnt wird, und von dieser Verdünnung nur 0.2–0.4 ml (0.6–1.2 mg Eiweiss) verwendet werden, kann dieser Wiederauffindungsfehler vernachlässigt werden.

TABELLE I

EIWEISSADSORPTION

Reihe	*Serum (ml)*	*Extinktion**	%
A	0.2	0.215	96.4
	0.4	0.211	94.6
	0.6	0.209	93.7
	0.8	0.209	93.7
	1.0	0.204	91.47
Kontrollwert:		0.223	100.0
B	0.2	0.425	96.6
	0.4	0.405	92.0
	0.6	0.400	90.9
	0.8	0.395	89.77
	1.0	0.390	88.63
Kontrollwert:		0.440	100.0

* Mittelwert der Doppelbestimmungen.

V. Hemmung der Trypsinaktivität durch definierte Inhibitoren

a. Sojabohnen-Inhibitor. Als nächstes wurden Untersuchungen mit Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor angestellt. Eine typische Hemmkurve zeigt Fig. 3.

0.1–0.7 ml Sojabohnen-Inhibitor-Lösung (50 μg/ml) wurden mit 1 ml Trypsin-Lösung *a* (100 μg/ml) versetzt, jeder Ansatz sofort mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml aufgefüllt und nach 1 Min 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 Min unter Lichtausschluss im Wasserbad bei 37° inkubiert, die Reaktion mit 1 ml $HClO_4$ abgestoppt, filtriert und mit je 1 ml klaren Filtrates pro Ansatz die oben angegebene Farbreaktion ausgeführt.

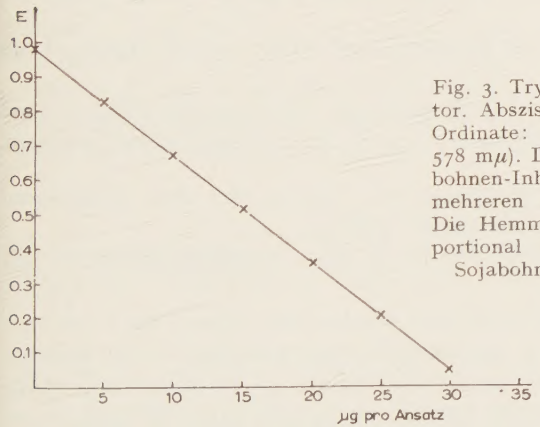

Fig. 3. Trypsin-Hemmkurve mit Sojabohnen-Inhibitor. Abszisse: μg Sojabohnen-Inhibitor pro Ansatz. Ordinate: Extinktionswert (1-cm Schicht, Filter 578 mμ). Die Abbildung zeigt die Wirkung des Sojabohnen-Inhibitors auf die Trypsinaktivität, die von mehreren Autoren[12, 15] bereits beschrieben wurde. Die Hemmung der Enzymaktivität ist direkt proportional der eingesetzten Inhibitormenge. 1 μg Sojabohnen-Inhibitor hemmt 3.18 μg Trypsin.

b. Trasylol (Kallikrein-Inaktivator). Mitteilung einer mit Trasylol hergestellten Hemmkurve und Untersuchungen mit Trasylol.

0.1–0.4 ml Trasylol-Lösung (1 : 10 verdünnt) werden mit je 0.5 ml Trypsin-Lösung *b* (100 μg/ml) und je 0.1 ml $CaCl_2$-Lösung angesetzt, mit Ca–Tris-Puffer auf 4.5 ml aufgefüllt und 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) hinzugegeben. Nach 30-minutiger Inkubationszeit bei 37° wird die Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$ abgestoppt, filtriert und die oben beschriebene Farbreaktion angeschlossen, Messung der Ex-

tinktionen im Filter-Photometer (Eppendorf), Schichtdicke 1 cm, Filter 578 mμ (Fig. 4).

Wiederauffindung von Trasylol im Serum

Später durchzuführende Untersuchungen des Serum-Trasylol-Spiegels nach intravenöser Gabe von Trasylol machen Versuche notwendig, welche die Wiederauffind-

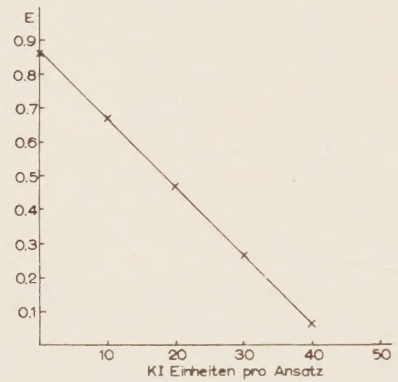

Fig. 4. Trypsin-Hemmkurve mit Trasylol. Abszisse: KI-Einheiten Trasylol pro Ansatz. Ordinate: Extinktionswerte (1-cm Schicht, Filter 578 mμ). Die Kurve zeigt die Hemmung von 100 μg Trypsin durch 10–40 KI-Einheiten Trasylol nach 30-minutiger Inkubationszeit in Gegenwart von Ca–Tris-Puffer und 2.5 mg Substrat. Umrechnung ergeben, dass 1 ml unverdünntes Trasylol 1.3 mg Trypsin hemmt.

barkeit von Trasylol im Serum mit der angegebenen Methode untersuchen. In Parallelversuchen wurde untersucht:

(1) Reihe a die Hemmung von 0.7 ml Trypsinlösung *b* 100 μg/ml) durch 0.1–0.3 ml 1 : 10 verdünnten Trasylols.
(2) Reihe b die Hemmung von 0.7 ml Trypsinlösung *b* (100 μg/ml) durch 0.1 ml 1 : 25 verdünntes Serum.
(3) Reihe c die Hemmung von 0.7 ml Trypsinlösung *b* (100 μg/ml) durch 0.1 ml 1 : 25 verdünntes Serum und durch 0.1–0.3 ml 1 : 10 verdünnten Trasylols.

Ausser der Reihe wurde ein Reagentienansatz mit Trypsin aber ohne Inhibitoren untersucht, im Folgenden als "Trypsinleerwert" geführt.

Ausführung. (1) Reihe a: Ausführung wie bei der Trypsin-Hemmkurve mit Trasylol.

(2) Reihe b und c: 0.1 ml 1 : 25 verdünntes Serum (bzw. 0.1–0.3 ml 1 : 10 verdünntes Trasylol und je 0.1 ml 1 : 25 verdünntes Serum) wird mit 0.7 ml Trypsinlösung und 0.1 ml $CaCl_2$-Lösung angesetzt und 60 Min bei 37° im Wasserbad vorinkubiert. Danach wird mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml aufgefüllt und 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) hinzugefügt. Nach 30-minutiger Inkubation bei 37° im Wasserbad Abstoppen der Reaktion mit 1 ml $HClO_4$, Filtrieren, Farbreaktion.

Wiederauffindung von Trasylol nach intravenöser Injektion

A. Einem Patienten mit Pankreatitis wurden 2 ml (= 2000 KI-Einheiten) Trasylol intravenös injiziert und Serum: (a) vor der Injektion, (b) ½ Std. nach der Injektion, (c) 1 Std. nach der Injektion entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 25 verdünnt und untersucht.

TABELLE II

Reihe	*Trasylol (ml)*	*Extinktion*
a	0.1	0.1000
	0.2	0.880
	0.3	0.760
b	0.1	0.925
c	0.1	0.790
	0.2	0.695
	0.3	0.590
Trypsinleerwert (Tr. LW)		1.115

Die Zusammenfassung und Auswertung der Ergebnisse zeigt Tabelle III.

TABELLE III

Trasylol	*Extinktion der Reihe c*	*Extinktionsdifferenzen*			*Summe der Extinktionsdifferenzen von Reihe a und b*
		der Reihe c zu Tr. LW	*der Reihe a zu Tr. LW*	*der Reihe b zu Tr. LW*	
0.1	0.790	0.325	0.115		0.305
0.2	0.695	0.420	0.235		0.425
0.3	0.590	0.525	0.355		0.545
				0.190	

Der Vergleich der Extinktionsdifferenzen in den Spalten 3 und 6 zeigt, dass zugesetztes Trasylol 100%-ig im Serum wiedergefunden wird.

Ausführung. 0.1–0.3 ml verdünntes Serum werden mit je 0.7 ml Trypsin-Lösung *b* und je 0.1 ml $CaCl_2$-Lösung angesetzt und 60 Min bei 37° im Wasserbad vorinkubiert. Dann Auffüllen mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml, Zugabe von 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) und 30-minutige Inkubationszeit bei 37° im Wasserbad. Danach Abstoppen der Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$, Filtrieren und Ausführung der angegebenen Farbreaktion. Messung der Extinktionen im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 1-cm Schicht und 578 mμ. Ergebnisse siehe Tabelle IV.

TABELLE IV

(a) Vor der Injektion		*(b) ½ Std. nach der Injektion*		*(c) 1 Std. nach der Injektion*	
Serum (ml)	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*
0.1	0.950	0.1	0.950	0.1	0.990
0.2	0.850	0.2	0.835	0.2	0.835
0.3	0.650	0.3	0.600	0.3	0.680
			Trypsinleerwert ohne Serum		1.050

Kritik der Werte: Die Extinktionswerte der drei Untersuchungsreihen gleichen sich und geben keinen Hinweis auf ein Ansteigen der Trypsin-Hemmwirkung des Serums.

B. Dem gleichem Patienten wurden einige Tage später 4 ml (= 4000 KI-Einheiten) Trasylol intravenös injiziert und Serum (a) vor der Injektion, (b) ½ Std. nach der Injektion entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 25 verdünnt und nach der unter A angegebenen Methode untersucht. Ergebnis siehe Tabelle V.

C. Zusatz von Trasylol direkt zum Serum und Bestimmung der Steigerung der Trypsinhemmung.

TABELLE V

(a) Vor der Injektion		*(b) $^1/_2$ Std. nach der Injektion*	
Serum (ml)	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*
0.1	0.940	0.1	0.935
0.2	0.800	0.2	0.800
0.3	0.630	0.3	0.630
0.4	0.485	0.4	0.490
		Trypsinleerwert ohne Serum	1.100

Kritik der Werte: Auch hier geht aus dem Vergleich der Extinktionswerte hervor, dass bei Gabe von 4000 KI-Einheiten Trasylol noch kein Ansteigen der Trypsin-Hemmwirkung des Serums festzustellen ist.

Ausführung. 0.2 ml 1 : 25 verdünntes Serum werden mit 0.7 ml Trypsin-Lösung *b* (100 μg/ml) und 0.1 ml $CaCl_2$-Lösung angesetzt, 0.2–0.3 ml Trasylol (1 : 10 verdünnt) hinzugegeben und wie unter A beschrieben untersucht. Ergebnisse siehe Tabelle VI.

TABELLE VI

Trasylol (ml)	*Extinktion*
0.2	0.680
0.3	0.550
Trypsinleerwert ohne Serum und Trasylol	1.100

Tabelle VI zeigt, dass 0.1 ml Trasylol (1 : 10 verdünnt) in 0.2 ml Serum (1 : 25 verdünnt) eine Zunahme der Trypsinhemmung um 8 μg gehemmtes Trypsin hervorruft. 4 ml unverdünntes Trasylol steigern demnach den Trypsininhibitorgehalt der Gesamtblutmenge (hier mit 7 l angenommen) um 0.0036571 μg gehemmtes Trypsin. Um eine Steigerung von rund 1 μg zu erhalten, müssten 1093.76 ml (= 1093760 KI-Einheiten) Trasylol gegeben werden. Da aber bei akuter Pankreatitis, wie aus späteren Untersuchungen hervorgeht, die Trypsin-Inhibitor-Kapazität der Gesamtblutmenge um 12.25 mg gehemmtes Trypsin ansteigen kann, müssten erheblich mehr KI-Einheiten Trasylol zugeführt werden, um durch Hemmung der Trypsinaktivität entscheidend in das Krankheitsgeschehen eingreifen zu können.

Erfolge, die bei der Trasylol-Therapie nicht zu übersehen sind, lassen es möglich erscheinen, dass Trasylol im Pankreas eine Konzentrierung erfährt.

VI. Serum-Hemmkurve

(1) *Ausführung.* 0.1–0.5 ml 1 : 10 verdünntes Mischserum werden mit je 1 ml Trypsin-Lösung *a* (100 μg/ml) angesetzt, mit Ca–Tris-Puffer auf 4.5 ml aufgefüllt und 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) hinzugefügt, 30 Min im Wasserbad unter Lichtabschluss bei 37° inkubiert, die Fermentreaktion danach mit 1 ml $HClO_4$ abgestoppt, filtriert und mit je 1 ml des klaren Filtrates die oben angegebene Farbreaktion ausgeführt. Die Messung der Extinktionswerte erfolgt im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 1-cm Schicht und 578 mμ gegen einen Reagentienleerwert.

Die Ergebnisse liegen bei graphischer Darstellung nicht auf einer Geraden, sondern auf einer s-förmig verlaufenden Kurve. Dieses Resultat spricht gegen eine stöchiometrische Bindung zwischen Trypsin und Inhibitor.

(2) Versuche mit verschiedenen Trypsinkonzentrationen (100 μg/ml und 200

μg/ml) und Substratkonzentrationen (20 mg/ml und 10 mg/ml), ausgeführt wie unter VI_1 angegeben, führten zu einer ähnlich s-förmig verlaufenden Kurve.

(3) Ähnliche Ergebnisse erzielten McCANN UND LASKOWSKI[11]. Sie erhielten nur linear verlaufende Kurven, wenn sie als Lösungsmittel für alle Reagentien 0.03–0.14 *M* NaCl-Lösungen benutzten.

Entsprechend diesen Angaben wurde der Puffer auf die molare NaCl-Konzentration von physiologischer NaCl-Lösung gebracht. Neben dem Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) wurde ein Tris-Puffer (pH 7.8) ohne Ca^{2+}, ausserdem eine Trypsinlösung *b* (100 μg/ml) ohne Ca^{2+} und HCl hergestellt.

Ausführung: Wie unter VI_1 angegeben, nur wurde Trypsinlösung *b* mit Ca–Tris-Puffer und Trypsinlösung *a* mit Tris-Puffer angesetzt. Beide Untersuchungsreihen führten zu dem gleichen Ergebnis, in Fig. 5 graphisch dargestellt als typische Kurve für die letzten drei Untersuchungen.

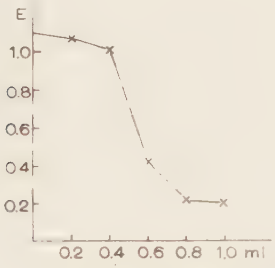

Fig. 5. Serum-Hemmkurve. Abszisse: ml Serum (1 : 10 verdünnt). Ordinate: Extinktion (Schicht 1 cm, Filter 578 mμ). Die Kurve zeigt die Hemmung von 1 ml Trypsinlösung *b* (100 μg/ml) durch 0.2–1.0 ml 1 : 10 verdünnten Serums. Physiologische Kochsalzlösung war Lösungsmittel für alle Reagentien. Das Trypsin–Serum–Puffer–Substrat-Gemisch wurde 30 Min bei 37° im Wasserbad inkubiert, danach 1 ml $HClO_4$ hinzugefügt, filtriert und die Farbreaktion ausgeführt, Messung der Extinktionswerte im Filter-Photometer (Eppendorf) gegen einen Reagentienleerwert ohne Trypsin.

(4) Der Einfluss des pH-Wertes im Reaktionsgemisch auf die Enzym-Hemmung. Ca–Tris-Puffer mit (a) pH 8.5; (b) pH 7.2.

Mit beiden Puffern wurden Untersuchungen angestellt. Ausführung wie unter VI_1 angegeben. (Um niedrigere Extinktionswerte zu erhalten, wurden nur 0.5 ml von der Trypsinlösung *b* je Ansatz verwendet.)

Ergebnis: Es zeigt sich, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf den Verlauf der Hemmkurve hat, die weiterhin s-förmig verläuft. (In den folgenden Versuchen wird wieder Ca-Tris-Puffer pH 7.8 verwendet, da bei diesem pH die tryptische Aktivität ihr Maximum hat.)

(5) Vorinkubation des Trypsin-Serum–Puffer-Gemisches. Um Enzym und Inhibitor längere Zeit in Abwesenheit des Substrates aufeinander einwirken zu lassen, wurden zwei Versuchsreihen mit 0.5 ml Trypsin-Lösung *b*, 1 : 10 verdünntem Serum und Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) angesetzt und vorinkubiert:

A. 30 Min: (a) bei Zimmertemperatur; (b) bei 37°.

B. 2 Std. bei 37°.

C. $2\frac{1}{2}$ Std. bei 37°.

Weitere Ausführung der Versuche wie unter VI_1 angegeben.

Ergebnisse: unverändert unregelmässige Hemmsprünge.

Fig. 6 zeigt das Ergebnis der Versuchsreihe B (2-stündige Vorinkubation) als typisches Kurvenbild für die letzten Versuche.

(6) MELCHIOR UND SLIWINSKI[51] fanden bei ihren Experimenten mit dem "Anti-Renin" und dem "Anti-Chymotrypsin" im Serum, dass Serum und Enzym mindestens 60 Min allein vorinkubiert werden müssen, damit der Inhibitor seine volle Wirksamkeit entwickeln kann.

An diese Versuche anlehnend wurde ein Trypsin-Serum-Gemisch vorinkubiert: (a) 60 Min bei 37° im Wasserbad, (b) 60 Min bei Zimmertemperatur.

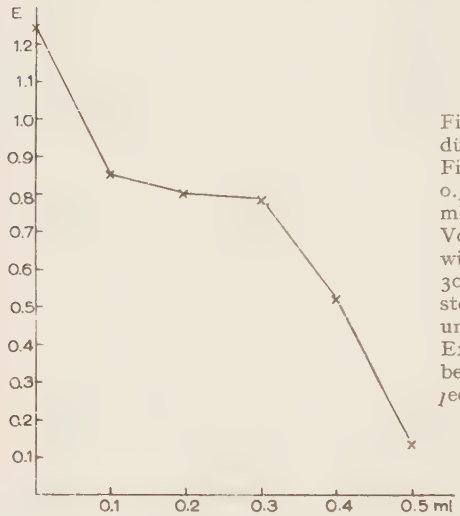

Fig. 6. Serum-Hemmkurve. Abszisse: ml 1 : 10 verdünntes Serum. Ordinate: Extinktion (1-cm Schicht, Filter 578 mμ). Die Kurve zeigt die Hemmung von 0.5 ml Trypsin-Lösung *b* (100 μg/ml) durch 0.1–0.5 ml 1 : 10 verdünnten Serums. Nach 2-stündiger Vorinkubation des Trypsin–Serum–Puffer-Gemisches wird 0.5 ml Substratlösung hinzugegeben, dann 30-minutige Inkubation bei 37° im Wasserbad, Abstoppen der Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$, Filtrieren und Ausführen der Farbreaktion. Messung der Extinktionswerte im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 1-cm Schicht und 578 mμ gegen Reagentienleerwert ohne Trypsin.

Ausführung: Je 0.7 ml Trypsin-Lösung *b* (100 μg/ml) werden mit 0.1–0.5 ml 1 : 10 verdünntem Serum angesetzt und 60 Min wie oben angegeben vorinkubiert. Danach Auffüllung mit Ca Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml, Hinzugeben von 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) und 30-minutige Inkubation im Wasserbad bei 37°; anschliessend Abstoppen der Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$, Filtrieren und Ausführung der oben angegebenen Farbreaktion. Das Ablesen der Extinktionen erfolgt im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 578 mμ und 1-cm Schicht gegen den Leerwert. Ergebnis: Tabelle VII.

TABELLE VII

(a) 60 Min Vorinkubationszeit bei 37°		*(b) 60 Min Vorinkubationszeit bei Zimmertemperatur*	
Serum (ml)	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*
Wert ohne Serum	0.810	Wert ohne Serum	1.560
0.1	0.630	0.1	1.220
0.2	0.435	0.2	0.770
0.3	0.240	0.3	0.295
0.4	0.069	0.4	0.105
0.5	0.070	0.5	0.095

Im Versuch (a) annähernd gleichmässige Hemmsprünge. Auffällig ist der Verlust der tryptischen Aktivität in der Untersuchungsreihe (a) im Vergleich zur Reihe (b).

Untersuchungen mit kürzeren Vorinkubationszeiten als 60 Min und mit 1 : 15

verdünntem Serum, um die Hemmsprünge kleiner zu halten, führten zu keinem verbesserten Ergebnis. Auch hier hoher Verlust der tryptischen Aktivität. Es musste Inaktivierung oder Selbstverdauung des Enzyms vorliegen. In den folgenden Versuchen wurde Ca^{2+}, bekannt als Enzymstabilisator, dem Vorinkubationsgemisch zugegeben.

Ausführung: In zwei Untersuchungsreihen wurden 0.1–0.5 ml 1 : 15 verdünntes Serum mit je (a) 0.7 ml Trypsinlösung *b* (100 µg/ml), (b) 0.5 ml Trypsinlösung *b* (100 µg/ml) und je 0.1 ml einer 0.25 *M* $CaCl_2$-Lösung angesetzt und 60 Min im Wasserbad bei 37° vorinkubiert. Dann wurde wie im vorhergehenden Versuch verfahren. Das Ergebnis zeigt Tabelle VIII.

TABELLE VIII

(a) 0.7 ml Trypsinlösung		*(b) 0.5 ml Trypsinlösung*	
Serum (ml)	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*
Wert ohne Serum	1.410	Wert ohne Serum	1.010
0.1	1.150	0.1	0.760
0.2	0.890	0.2	0.529
0.3	0.640	0.3	0.275
0.4	0.385	0.4	0.065
0.5	0.145	0.5	0.067

Es wurden ideal gleichmässig Hemmsprünge erhalten. Durch Zugabe von Ca^{2+} zum Vorinkubationsgemisch blieb die volle Aktivität des Enzyms erhalten. Da die Versuche mit 0.7 ml Trypsinlösung zu Extinktionen weit über 1.000 hinausführten und damit in den Messfehlerbereich des verwendeten Filter-Photometers fielen, wurde für die weiteren Versuche nur noch 0.5 ml Trypsinlösung pro Ansatz genommen. Tabelle VIII (b) zeigt, dass 0.4 ml und 0.5 ml 1 : 15 verdünntes Serum 50 µg Trypsin völlig hemmen. Es wurde deshalb ein neuer Versuch mit 1 : 25 verdünntem Serum und 0.5 ml Trypsinlösung *b* durchgeführt. Ausführung wie im letzten Versuch. Ergebnis siehe Fig. 7

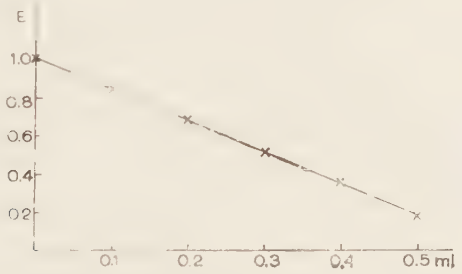

Fig. 7. Trypsin-Hemmkurve mit Serum. Abszisse: ml Serum (1 : 25 verdünnt). Ordinate: Extinktion (Schicht 1 cm, Filter 578 mµ). 0.1–0.5 ml 1 : 25 verdünnten Serums wurden mit je 0.5 ml Trypsinlösung *b* (100 µg/ml) und 0.1 ml $CaCl_2$-Lösung 60 Min im Wasserbad bei 37° vorinkubiert; dann Auffüllen mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml und Hinzufügen von 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml). Jeder Ansatz wird 30 Min bei 37° im Wasserbad inkubiert; danach Abstoppen der Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$. Filtrieren und Ausführung der oben angegebenen Farbreaktion. Messung der Extinktionswerte erfolgte im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 1-cm Schicht und 578 mµ gegen der Reagentienleerwert.

Es ergaben sich ideal gleichmässige Hemmsprünge, die bei graphischer Darstellung auf einer Geraden liegen. Der Verlauf der Kurve spricht für eine stöchiometrische, nicht dissoziierbare Verbindung zwischen Trypsin und seinem Seruminhibitor im pH-Bereich des Versuches

(7) Die unter VI_3 erwähnte und von MC[illegible]ND LASKOWSKI berichtete Bedeutung von physiologischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel wurde noch einmal unter den in VI_6 beschriebenen Bedingungen untersucht. Herstellung eines (a) NaCl-haltigen Ca–Tris-Puffers (0.9%), (b) NaCl-freien Puffers.

Ausführung: Mit der unter VI_6 beschriebenen Methode wurde je eine Versuchsreihe mit Puffer (a) und (b) angesetzt. Ergebnis siehe Tabelle IX.

TABELLE IX

(a) mit NaCl		*(b) ohne NaCl*	
Serum (ml)	*Extinktion*	*Serum (ml)*	*Extinktion*
Wert ohne Serum	0.790	Wert ohne Serum	0.755
0.1	0.640	0.1	0.610
0.2	0.485	0.2	0.475
0.3	0.335	0.3	0.335
0.4	0.180	0.4	0.195
0.5	0.065	0.5	0.060

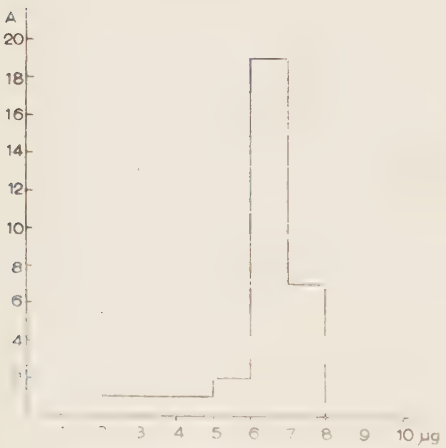

Fig. 8. Abszisse: Trypsin-Inhibitor-Kapazität, angegeben in µg gehemmten Trypsins. Ordinate: Anzahl der untersuchten Seren. Die Kurve zeigt die Trypsin-Inhibitor-Kapazität von 31 Blutspenderseren. Deutlich zeichnet sich ein Maximum zwischen 6 und 7 µg gehemmten Trypsins ab. Dieser Wert wird als Normalbereich angenommen.

Wiederum zeigt sich beim Vergleich der Reihen (a) und (b) keinerlei Abweichung die auf eine besondere Bedeutung der physiologischen Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel hindeuten könnte.

VII. Ergebnisse

A. Methode für die Bestimmung des Serum-Trypsininhibitors: 0.2–0.4 ml 1 : 25 verdünnten Serums werden mit je 0.5 ml Trypsin-Lösung *c* (100 µg/ml) gemischt und im Wasserbad bei 37° 60 Min vorinkubiert, danach wird jeder Ansatz mit Ca–Tris-Puffer (pH 7.8) auf 4.5 ml aufgefüllt und 0.5 ml Substratlösung (5 mg/ml) hinzugefügt. Nach erneuter Inkubationszeit von 30 Min im Wasserbad bei 37° wird die Reaktion mit je 1 ml $HClO_4$ abgestoppt. Nach dem Filtrieren wird mit je 1 ml des klaren

Filtrates die unter *I* angegebene Modifikation der BRATTON-MARSHALL Reaktion ausgeführt. Die Extinktion der entstandenen blauen Farbe wird im Filter-Photometer (Eppendorf) bei 578 mμ und 1-cm Schicht gegen den Leerwert (Ansatz ohne Trypsin) abgelesen.

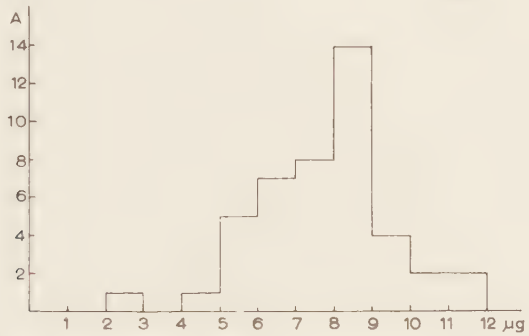

Fig. 9. Abszisse: Trypsin-Inhibitor-Kapazität, angegeben in μg gehemmten Trypsins. Ordinate: Anzahl der untersuchten Seren. Die Kurve zeigt die Höhe des Serum-Trypsin-Inhibitors bei 44 an Hepatitis erkrankten Patienten. Ein deutliches Maximum ist bei 8–9 μg gehemmten Trypsins festzustellen. Der Streubereich der Werte erstreckt sich jedoch von 5–12 μg Trypsin und reicht damit vom Normalbereich bis zu Werten, die bei Patienten mit Leberzirrhose gefunden werden. Eine Unterteilung der Hepatitis an Hand der Untersuchungsergebnisse in akute H. und chronische H. ist nicht möglich. Allerdings scheint der Serum-Trypsin-Inhibitor im Anfangsstadium der akuten Hepatitis etwas höher als 8–9 μg gehemmtes Trypsin zu liegen.

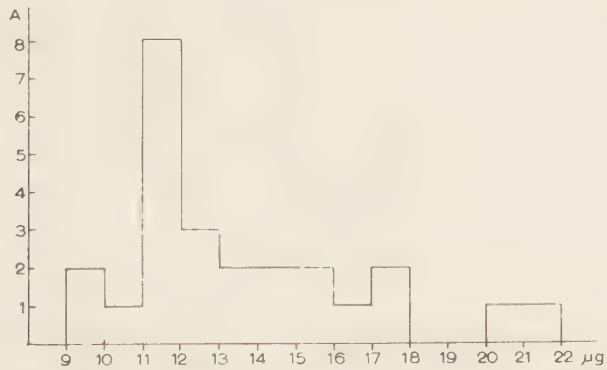

Fig. 10. Abszisse: Trypsin-Inhibitor-Kapazität, angegeben in μg gehemmten Trypsins. Ordinate: Anzahl der untersuchten Seren. Diese Kurve fasst die Ergebnisse der Untersuchungen von 25 an Leberzirrhose erkrankten Patienten zusammen. Das Maximum der Trypsin-Hemmung liegt bei 11–13 μg gehemmten Trypsins, und ist damit deutlich höher als der Normalwert. Ob aus der grossen Streubreite von 9–22 μg auf Verlaufsform oder Stadium zu schliessen ist, müsste eingehender untersucht werden.

B. Klinische Ergebnisse: Mit dieser Methode wurden die Seren von 171 Personen untersucht. Davon waren 31 Blutspender; 44 waren an Hepatitis, 25 an Leberzirrhose, 15 an malignen Erkrankungen, 6 an Pankreatitis und 6 an Diabetes mellitus erkrankt. Der Rest der Patienten verteilt sich auf Krankheiten, die aus den Tabellen XII-XIV hervorgehen.

TABELLE X

Diagnose	*Zahl der Fälle*	*Höhe des Inhibitors in µg gehemmtes Trypsin*
Diabetis mellitus	7	9.35
		6.75
		7.35
		10.5
		8.35
		7.5
		9.75

Beim Diabetes mellitus zeigt sich eine mässige Erhöhung des Inhibitors im Serum.

TABELLE XI

Diagnose	*Zahl der Fälle*	*Höhe des Inhibitors in µg gehemmtes Trypsin*
Pankreatitis	6	5.5
		7.5
		9.0
		10.6
		13.85
		14.0

Die Pankreatitis zeigt deutlich erhöhte Werte, die im akuten Fall sogar bis auf das Doppelte des Normalwertes ansteigen können.

TABELLE XII

Diagnose	*Zahl der Fälle*	*Höhe des Inhibitors in µg gehemmtes Trypsin*
Gastritis	2	8.1
		7.75
Umbau-Gastritis	1	7.6
Zustand nach Magenresektion	4	4.15
		5.3
		4.0
		6.25
Ulcus duodeni	1	7.25
Ulcus ventriculi	2	8.6
		9.35
Partieller Verschlussikterus	3	6.0
		10.1
		13.6

Auffallend ist die Verminderung des Inhibitor-Gehaltes nach Magenresektion. Eine Erhöhung des Inhibitors finden wir bei Ulcus ventriculi. Die hohen Werte bei Verschlussikterus (es handelte sich nur um Steinverschlüsse) könnten auf eine Begleitpankreatitis zurückzuführen sein.

DISKUSSION

Wie auch unsere Ergebnisse zeigen, ist im Serum keine freie Trypsinaktivität nachweisbar. Die Messergebnisse von NARDI[36, 37] erscheinen deshalb nicht stichhaltig. Er dürfte vermutlich, wie auch BROWN[38], allenfalls eine zunächst nicht näher zu charakterisierende Exopeptidase im Serum bei Pankreaserkrankungen nachgewiesen haben.

TABELLE XIII

Diagnose	*Zahl der Fälle*	*Höhe des Inhibitors in µg gehemmtes Trypsin*
Primäres Leber-Ca	1	14.8
Lebertumor	1	10.5
Magen-Ca	1	12.75
Cardia-Ca	2	13.6
Colon-Ca	1	12.0
Collum-Ca	1	9.85
Ovarial-Ca	1	26.5
Lymphosarkom	1	7.35
Myelom	1	17.5
Plasmocytom	2	7.0
		10.4
Bronchial-Ca	1	15.85
Sarkom	1	12.75
Melanoblastom	1	14.9

Bei malignen Erkrankungen ist bei 87% der untersuchten Fälle eine Erhöhung des Trypsin-Inhibitors festzustellen. Eine Einteilung der Erkrankungen nach der Höhe des Trypsin-Inhibitors war nicht möglich, da das Krankengut zu klein war. Auffällig ist der hohe Inhibitorspiegel bei dem Ovarial-Ca.

TABELLE XIV

Diagnose	*Zahl der Fälle*	*Höhe des Inhibitors in µg gehemmtes Trypsin*
Erbsche Dystrophie	1	11.25
Muskelschwäche	1	9.6
Bornholmer Krankheit	1	5.0
Morbus Cushing	2	7.25
		11.75
Morbus Addison	2	19.75
		7.5
Chronische Nephritis	1	10.1
Nephrose	1	6.7
Herzinfarkt	4	5.78
		9.5
		6.0
		8.0
Angina pectoris	1	14.5
Status asthmaticus	1	12.6
Arterielle Durchblutungsstörungen	1	3.6
Lymphogranulomatose	3	13.35
		14.0
		8.85
Perniciosa	1	7.6
Polycythaemie	1	5.6
Budd-Chiari-Syndrom	1	14.75
Hyperthyreose	1	8.6
Struma substernalis	1	7.25
Vegetative Dystonie		
Ulcus cruris	1	8.0
Tuberculose	2	8.8
		13.65
Typhus-Dauerausscheider	1	10.9

Die Tabelle XIV zeigt die Höhe des Trypsin-Inhibitors bei den verschiedensten Krankheiten.

Vielmehr können wir frühere Befunde bestätigen, dass im Serum ein bemerkenswert hoher Trypsin-Inhibitor-Gehalt vorhanden ist.

Die in der Literatur mitgeteilten Normalwerte stimmen mit den von uns ermittelten in der Grössenordnung überein, selbst bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Methoden.

TABELLE XV

Autoren	*mg Trypsin gehemmt durch 1 ml unverdünntes Serum*
HOMER *et al.*[52]	0.45 –1.28
SHULMAN[6]	0.750–3.750
Unsere Ergebnisse	1.50 –1.875

Bei Durchsicht der in Tabelle X–XIV aufgeführten Ergebnisse fällt auf, dass abnorm niedrige Werte bei Patienten mit Magenresektion nach Billroth II, und sicher erhöhte Trypsin-Inhibitor-Werte bei an Pankreatitis, Leberzirrhose, Hepatitis, Verschlussikterus und Malignomen erkrankten Personen von uns beobachtet wurden. Über die Ursache der Veränderungen können wir in keinem der Fälle eine exakte Erklärung geben. Als Arbeitshypothese scheint uns aber die Annahme brauchbar zu sein, dass bei Zellzerfall in Organen mit hoher Eiweisssynthese (Pankreas) oder neoplastischen Zellwucherungen zellständige Endopeptidasen-(Trypsin-)Inhibitoren vermehrt in das Serum übertreten.

Inwieweit die Bestimmung der Trypsin-Inhibitor-Kapazität des Serums solcher Erkrankungen von klinischer Bedeutung ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Trypsin-Inhibitor-Kapazität im Serum mit einem trypsinspezifischen, niedermolekularen Substrat (N-Benzoyl-*d*, *l*-arginin-β-naphthylamid-HCl) angegeben.

Das Ausmass der Trypsin-Hemmung durch Serum wird mit einer Modifikation der BRATTON-MARSHALL-Reaktion bestimmt und in Gewichtseinheiten gehemmten Trypsins angegeben. Die Ergebnisse sind reproduzierbar. Mit dieser Methode wurde die Trypsin-Inhibitor-Kapazität bei verschiedenen Krankheitsbildern untersucht. Die Ergebnisse werden diskutiert.

SUMMARY

THE TRYPSIN-INHIBITING CAPACITY OF SERUM

A colorimetric technique is described for the determination of the trypsin-inhibiting capacity of serum with a specific low-molecular substrate, N-benzoyl-*d*, *l*-arginine-β-naphthylamide-HCl. The degree of trypsin inhibition of the serum is determined by a modification of the BRATTON-MARSHALL reaction, and the values are given in units of weight. The results of the reaction are reproducible. The values of the trypsin-inhibiting capacity found in various pathological conditions are given and discussed.

LITERATUR

1 L. Camus und E. Gley, *Compt. rend. soc. biol.*, 47 (1897) 825.
2 C. Delezenne und E. Pozerski, *Compt. rend. soc. biol.*, 55 (1903) 327.
3 L. R. Christensen, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1946) 149.
4 K. Landsteiner, *Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I Ref.*, 27 (1900) 357.
5 E. S. Duthie und I. Lorenz, *Biochem. J.*, 44 (1949) 167.
6 N. R. Shulman, *J. Exptl. Med.*, 95 (1952) 593.
7 K. Jacobsson, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, Suppl. No. 14, 7 (1955) 57.
8 J. H. Northrop und R. G. Hussey, *J. Gen. Physiol.*, 5 (1922) 335.
9 D. Grob, *J. Gen. Physiol.*, 26 (1942) 405.
10 N. R. Shulman, *J. Exptl. Med.*, 95 (1952) 571.
11 S. F. McCann und M. Laskowski, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 147.
12 M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1947) 291.
13 R. J. Peanasky und M. Laskowski, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 153.
14 T. Viswanatha, M. J. Pallansch und I. E. Liener, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 301.
15 T. Viswanatha und I. E. Liener, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 97.
16 T. Viswanatha und I. E. Liener, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 777.
17 L. R. Christensen, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 10 (1958) 177.
18 H. F. Bundy und J. W. Mehl, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1124.
19 M. Laskowski und Wu Feng Chi, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 797.
20 F. C. Moll, S. F. Sunden und J. R. Brown, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 121.
21 J. L. Grey, S. G. Priest, W. F. Blatt, U. Westphal und H. Jensen, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 56.
22 E. E. Sale, S. G. Priest und H. Jensen, *J. Biol. Chem.*, 227 (1957) 83.
23 D. Grob, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1945/46) 219.
24 M. L. Anson, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
25 E. Werle und B. Kaufmann-Boetsch, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, 319 (1960) 52.
26 E. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Denaturia und G. Künster, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, 161 (1926) 191.
27 J. H. Northrop und M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, 16 (1932) 313.
28 T. Astrup und S. Müllertz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40 (1952) 346.
29 T. Astrup und I. Sterndorff, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 7 (1955) 239.
30 B. J. Katchman, R. E. Zipf und G. M. Homer, *Nature*, 185 (1960) 238.
31 M. J. Grossmann, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 99 (1958) 304.
32 N. R. Shulman und H. J. Tagnon, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 69.
33 S. Bergmann, S. Fruton und H. Pollock, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 643.
34 K. Hofmann und M. Bergmann, *J. Biol. Chem.*, 131 (1939) 81.
35 G. W. Schwert, H. Neurath, S. Kaufmann und J. S. Snoke, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 221.
36 G. L. Nardi, *J. Lab. Clin. Med.*, 52 (1958) 66.
37 G. L. Nardi und C. W. Lees, *New Engl. J. Med.*, 258 (1958) 797.
38 E. J. Conway, *Microdiffusion Analysis*, Crosby Lockwood & Son, Ltd., London, 1950.
39 M. E. Brown, *J. Lab. Clin. Med.*, 55 (1960) 616.
40 G. W. Schwert und Y. Takenaka, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 570.
41 E. Ronwin, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 38 (1960) 57.
42 H. A. Ravin, Ph. Bernstein und A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 1.
43 H. A. Ravin und A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 391.
44 G. Wolf und A. M. Seligman, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2080.
45 M. N. Green, K. Ch. Tsou, R. Pressler und A. M. Seligman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 57 (1955) 458.
46 M. M. Nachls und A. M. Seligman, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 343.
47 A. Riedel und E. Wünsch, *Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, 316 (1959) 61.
48 H. Schön und B. Rässler, *Clin. Chim. Acta*, 6 (1961) 583.
49 H. Schön und B. Rässler, *Naturwissenschaften*, 48 (1961) 52.
50 A. C. Bratton und E. K. Marshall, Jr., *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 537.
51 J. Melchior und R. Sliwinski, *Federation Proc.*, 16 (1957) 221.
52 G. M. Homer, R. E. Zipf, T. E. Hieber und B. J. Katchman, *Am. J. Clin. Pathol.*, 34, No.2 (1960) 99.

Lebenslauf.

Am 20. 9. 1936 wurde ich, Jörg Alter, als zweites Kind des Volksschullehrers Dr. Otto Alter und dessen Ehefrau Anneliese, geborene Kohlbach, in Burkersroda bei Naumburg a. d. Saale geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Oppin bei Halle/Saale. Dort wurde ich am 1. 9. 1942 in die Volksschule, die ich bis zu meinem zwölften Lebensjahr besuchte, eingeschult. 1949 verzogen meine Eltern nach Guxhagen bei Kassel. Von dort aus besuchte ich das Realgymnasium in Melsungen. Am 8. 3. 1957 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab. Anschließend nahm ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen auf und legte am 28. 10. 1959 hier die ärztliche Vorprüfung ab. Danach studierte ich zwei Semester an der Freien Universität in Berlin. Im November 1960 kehrte ich an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zurück und bestand hier am 18. 2. 1963 das Staatsexamen.